

⑬ 日本国特許庁 (JP)

① 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭59—204200

⑤ Int. Cl.<sup>9</sup>  
C 07 H 21/02  
G 01 N 33/54  
// C 12 Q 1/68  
G 01 N 33/50

識別記号

庁内整理番号  
7252—4C  
H 7906—2G  
8213—4B  
Z 8305—2G

④ 公開 昭和59年(1984)11月19日

発明の数 2  
審査請求 未請求

(全 9 頁)

⑭ 2, 4-ジニトロフェニルヌクレオチド誘導体およびその製造法

① 特 願 昭58—75878

② 出 願 昭58(1983)4月28日

③ 発 明 者 三好健一

広島県高田郡甲田町下甲立1624

湧永製薬株式会社中央研究所内

④ 発 明 者 鈴木正則

⑤ 発 明 者 不破亨

広島県高田郡甲田町下甲立1624

湧永製薬株式会社中央研究所内

⑥ 出 願 人 湧永製薬株式会社

大阪市福島区福島三丁目1番39

号

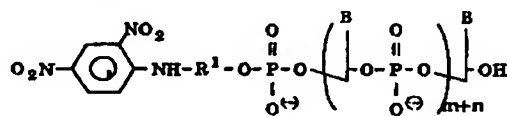
⑦ 代 理 人 弁理士 猪股清 外3名

## 明 細 書

1. 発明の名称 2, 4-ジニトロフェニルヌクレオチド誘導体およびその製造法

## 2. 特許請求の範囲

1. 下式〔Ⅷ〕で示される2, 4-ジニトロフェニル-オリゴデオキシリボヌクレオチドであることを特徴とする、2, 4-ジニトロフェニルヌクレオチド誘導体。



〔Ⅷ〕

〔ただし、mおよびnはそれぞれ0または任意の自然数であり、R¹は2価の直鎖または分岐鎖の炭化水素残基であり、Bはヌクレオチドを構成する塩基である（Bが複数個存在するとき

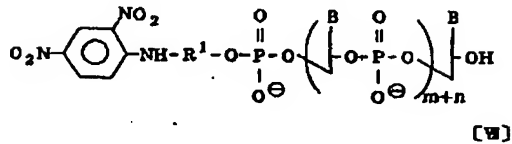
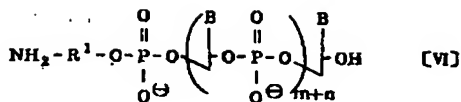
は、それらは同一でも異なってもよい）。〕

2. 塩基Bがアデニン、チミン、シトシンおよびグアニンからなる群より選ばれたものである、特許請求の範囲第1項記載の2, 4-ジニトロフェニルヌクレオチド誘導体。

3. R¹が炭素数2〜20の直鎖または分岐鎖のアルキレン基である、特許請求の範囲第1項または第2項記載の2, 4-ジニトロフェニルヌクレオチド誘導体。

4. mが0または6までの自然数、nが0または40までの自然数である、特許請求の範囲第1〜3項のいずれか一項に記載の2, 4-ジニトロフェニルヌクレオチド誘導体。

5. 下式〔Ⅷ〕で示されるオリゴヌクレオチド誘導体の末端アミノ基に2, 4-ジニトロベンゼンを結合させて下式〔Ⅷ〕で示される2, 4-ジニトロフェニル-オリゴデオキシリボヌクレオチドを得ることを特徴とする、2, 4-ジニトロフェニルヌクレオチド誘導体の製造法。



〔ただし、 $m$ および $n$ はそれぞれ0または任意の自然数であり、 $\text{R}^1$ は2価の直鎖または分岐鎖の炭化水素残基であり、 $\text{B}$ はヌクレオチドを構成する塩基である（ $\text{B}$ が複数個存在するときは、それらは同一でも異なってもよい）。〕

6. アミノ基と2, 4-ジニトロベンゼンとの結合を、アミノ基と1-ハロゲン-2, 4-ジニトロベンゼンとの脱ハロゲン化水素反応によって行なわせる。特許請求の範囲第5項記載の2, 4-ジニトロフェニルヌクレオチド誘導体の製造法。

7. 1-ハロゲン-2, 4-ジニトロベンゼンが

フェニル（以下DNPと略す）基を核酸に結合させた、DNAプローブが開発されている（Nucl. Acids Res., 10, 6787-6796（1982））。彼らは、アデノシントリリン酸（ATP）のDNP誘導体をDNA鎖に取り込ませ、相補的塩基配列を持つDNAにハイブリダイズさせたのち、DNPに対するウサギ抗血清およびペーオキシダーゼで標識したウサギ免疫グロブリンG型（IgG）に対するヒツジ抗血清を順次加えて目的DNAを検出している。ここで用いたDNA鎖は、天然から取り出したフラグメントである。

しかし、本発明者らの知るところによれば、このようにして製造されるDNP-ヌクレオチド誘導体には下記のような問題点がある。

- (i) ヌクレオチドの塩基部分にDNPを含有するため、使用オリゴヌクレオチド固有の融解温度（ $T_m$ 値）に変化を生じる。
- (ii) 任意でかつ定められた塩基配列をもつDNAの合成が困難である。

これらの理由によつて、現段階でのDNP-ヌ

1-フルオロ-2, 4-ジニトロベンゼンである。特許請求の範囲第6項記載の2, 4-ジニトロフェニルヌクレオチド誘導体の製造法。

### 3. 発明の詳細な説明

#### 発明の背景

#### 技術分野

本発明は、一般に、2, 4-ジニトロフェニルヌクレオチド誘導体に関する。さらに具体的には、本発明は、ヌクレオチドの塩基以外の部分に2, 4-ジニトロベンゼンを結合させてなる2, 4-ジニトロフェニルヌクレオチド誘導体に関する。本発明は、また、このような2, 4-ジニトロフェニルヌクレオチド誘導体の製造法にも関する。

#### 先行技術

放射性同位元素を使わず、特殊な抗体や酵素によつて検出することができる、ポリマーオリゴヌクレオチド誘導体は、核酸用アフィニティープローブとして興味を持たれている。

近年、Vincentらによつて、2, 4-ジニトロ

フェニルヌクレオチド誘導体は、その応用範囲が狭く、有用性が限定されているのが現状である。

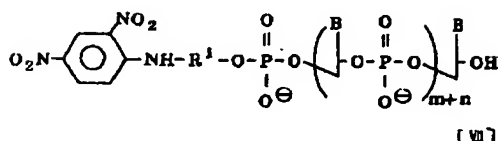
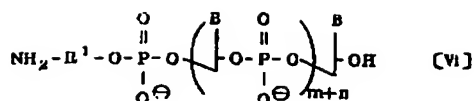
#### 発明の概要

#### 要旨

本発明は上記の点に解決を与えることを目的とし、特定のオリゴデオキシリボヌクレオチドのヌクレオチド塩基以外の特定部位に2, 4-ジニトロベンゼンを結合させてなるDNP-ヌクレオチド誘導体によつてこの目的を達成しようとするものである。

従つて、本発明によるDNP-ヌクレオチド誘導体は下式〔Ⅷ〕で示されるDNP-オリゴデオキシリボヌクレオチドであること、を特徴とするものである。

また、本発明によるDNP-ヌクレオチド誘導体の製造法は、下式〔Ⅷ〕で示されるオリゴヌクレオチド誘導体の末端アミノ基に2, 4-ジニトロベンゼンを結合させて下式〔Ⅷ〕で示されるDNP-オリゴデオキシリボヌクレオチドを得ること、を特徴とするものである。



[ただし、 $m$ および $n$ はそれぞれ0または任意の自然数であり、 $\text{R}^1$ は2箇の直鎖または分岐鎖の炭化水素残基であり、 $\text{B}$ はヌクレオチドを構成する塩基である( $\text{B}$ が複数個存在するときは、それらは同一でも異なってもよい)。]

#### 効 果

本発明者らの合成したDNP-オリゴデオキシリボヌクレオチドは、前記核酸用非放射性アフィニティプローブの短所を回避することができて、下記のような長所をもつものである。

(i) ヌクレオチドの塩基部分にDNPを含有しないので、融解温度( $T_m$ 値)に変化を生じることが

DNP-ヌクレオチド誘導体の利用方法の拡大も考えられる。

すなわち、たとえば、DNP-オリゴヌクレオチドは、非放射性核酸用アフィニティプローブとして、あるいはプライマーとして、利用可能であることは前記したところであつて、その検出方法は抗体による沈降、酵素免疫活性測定、蛍光性染色体による可視化等々、多様であり、また本発明のDNP-ヌクレオチド誘導体は放射性プローブ( $^{32}\text{P}$ )に比べて被曝の危険、コスト、廃棄物の処理および保存性の点でも有利である。

なお、DNP基は、市販のウサギ抗血清(たとえば Miles Laboratories, Code No. 61-006-1)または、DNPに対するモノクローナル抗体によつて容易に検出することができる。

#### 発明の具体的説明

##### DNPヌクレオチド誘導体 [Ⅷ]

本発明によるDNPヌクレオチド誘導体は、前記の式[Ⅷ]で示されるものである。

なくて安定である。

- (ii) いかなる塩基配列をもつDNP-オリゴヌクレオチドも合成可能である。
- (iii) プローブとして短鎖オリゴマーで十分である。
- (iv) 合成が非常に簡単であつて大量合成が可能であり、また長期保存も可能である。
- (v) プライマー(鎖型合成の際のDNA断片)としても利用できる。

最近、板倉らは、鎖長19の合成オリゴヌクレオチドを用いて $\beta$ -グロビンの遺伝子病の診断を行なつており(Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 80, 278-282(1983)、遺伝子中のわずか一つの塩基配列の違いも検出できる合成オリゴヌクレオチドが各種遺伝子病解析に有用であることを示している。

彼らは合成オリゴヌクレオチドの放射性同位元素( $^{32}\text{P}$ )を使用したか、代わりに本発明者らが開発したDNP-ヌクレオチド誘導体を用いることができれば、非常に有用なことは明白であろう。

このような長所があるところから、本発明の

式中、記号  $\text{B}$  は、2'-デオキシリボヌクレオ

シドの3'-および5'-水酸基を除いたデオキシリボヌクレオシド残基を示すのに慣用されているものであつて、具体的には下記の構造のものである。



置換基 $\text{B}$ はヌクレオチドを構成する塩基を示し、通常はアデニン、チミン、シトシンまたはグアニンである。化合物[Ⅷ]中に $\text{B}$ が複数個存在するときは、それらは同一でも異なってもよい。

$m$ および $n$ は、それぞれ0または自然数を示す。本発明DNPオリゴヌクレオチド誘導体の重合度が $m+n$ で表示されているのは、本発明の好ましい製造法で重合度がそれぞれ $m$ および $n$ のフラクションを縮合させていることによるものである(詳細後記)。その場合の $m$ は実用的には0~6、特に1~4、 $n$ は実用的には0~40、特に0~20、

である。

基  $R^1$  は、化合物 [W] の核酸部分と DNP 部分とを連結する二価の直鎖または分岐鎖の炭化水素残基である。これは、特に炭素数 2~20 程度の直鎖または分岐鎖のアルキレン基が適当である。好ましい  $R^1$  は、炭素数 2~6 のアルキレン基である。

#### 化合物 [W] の合成

##### 一般的説明

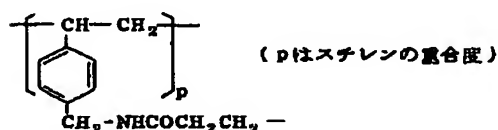
化合物 [W]、すなわち本発明による DNP-ヌクレオチド誘導体、は合目的的な任意の方法によって合成することができる。

一つの好ましい方法は、前記の式 [VI] のオリゴヌクレオチド誘導体、すなわちオリゴデオキシヌクレオチドの 5'-末端リン酸基に基  $R^1$  を介して一級アミノ基が導入されたもの、のアミノ基に DNP を結合させることからなるものである。

一方、式 [VI] の化合物は、オリゴヌクレオチドの合成および生成オリゴヌクレオチドの 5'-水酸基延長上での一級アミノ基の導入からなる方法で合成することができる。

イルアデニン、N-イソプテリルグアニン、 $N^6$ -ベンゾイルグアニンおよびチミン（すなわち、保護不要）より選択される。

⑩ スペースを介した担体であつて、通常は下記のものである。



#### 化合物 [VI] の合成

一般にオリゴヌクレオチド合成法としては、トリエステル法、ホスファイト法およびそれぞれの固相法および液相法がある。本発明者らは既に固相法によるオリゴヌクレオチド製造技術を開発しており、化合物 [VI] の合成には本発明者らの下記の方法が好ましい。

Tetrahedron Letters 1979, 3635(1979)

Nucleic Acids Research 8, 5473(1980)

Nucleic Acids Research 8, 5491(1980)

第 1 図は、この好ましい合成法の一例を示すフローチャートである。フローチャート中の記号は、下記の意味を持つ（その意義ないし詳細は、後記した通りである）。

$R^0$  リン酸基を保護する置換基であつて、通常オルトクロロフェニル基が用いられる。

$R^1$  二価の炭化水素残基である。

$R^2$  5'-末端水酸基の保護基であつて、通常ジメトキシトリチル基が用いられる。

$R^3$  他のすべての保護基が安定な条件下で容易に脱離されて、リン酸ジエステルを与えることができる置換基であつて、通常シアノエチル基が用いられる。

$R^4$  アミノ基の保護基であつて、通常トリフルオロアセチル基が用いられる。

q n より小さい任意の自然数。

m 0 または任意の自然数。

n 0 および任意の自然数。

B 塩基を示す。

B' 保護された塩基を示すが、通常は  $N^6$ -ベンゾ

Nucleic Acids Research 8, 5507(1980)

Nucleic Acids Research Symposium Series

7, 281(1980)

また、上記で合成したオリゴヌクレオチドの 5'-水酸基にリン酸基を介して一級アミノ基を導入する方法、すなわち化合物 [VI] の合成法としては、たとえば本発明者らの特願昭 57-138136 号明細書記載の方法がある。

化合物 [VI] の合成法をその一実施態様について示せば、下記の通りである。すなわち、第 1 図に示したように、化合物 [I] の保護基  $R^3$  を除去したものと化合物 [II] の保護基  $R^2$  を除去したものとを縮合させ、これらの操作をくり返すことによつて、化合物 [W] を合成する。オリゴヌクレオチド化合物 [III] の合成法は、上記の通り公知である。

一方、本発明者らの方法（特願昭 57-138136 号明細書参照）に従つて、式 [IV] の化合物を合成する。すなわち、化合物 [I] の  $R^3$  を除去して 5'-水酸基化合物とし、これにリン酸化剤（たとえば、ホスホトリアゾリド、ホスホジクロリドま

たはホスホジベンゾトリアゾリド等)を作用させてリン酸化し、ついでアミノ基が保護されているアミノアルコール化合物  $R^2-NH-R^1-OH$  [この化合物はオメガ-アミノアルコール ( $NH_2-R^1-OH$ ) のアミノ基を  $R^2$  で保護することにより得ることができる] を縮合させることにより、化合物 [IV] を得ることができる(詳細は説明欄参照)。

この化合物 [IV] の保護基  $R^2$  を除去し、化合物 [III] の保護基  $R^2$  を除去したものと縮合させて、化合物 [V] を合成する。縮合は、化合物 [IV] の合成の際の縮合と本質的には変わらない方法で行なうことができる。

このようにして合成された化合物 [V] の保護基をすべて除去すれば、化合物 [VI] が得られる。保護基  $CO-\sim\textcircled{a}$ 、リン酸トリエステル中のオルトクロロフェニル基および塩基部分のアシル基は、0.5 M のテトラメチルグアニジン-ピリジン-2-カルボアルドキシムのジオキサン-水(9:1, (V/V)) 溶液で処理後、アルカリ処理(濃アンモニア水)を行なうことにより除去される。 $R^4$  が

させることによつて得ることができる。

両者の結合は、2, 4-ジニトロベンゼンの1-位と化合物 [VI] のアミノ基との間の C-N 結合の形成を実現することのできる任意の方法によつて行なうことができる。

両者の結合は、一般に、前者の誘導体、すなわち DNP-X (X は 1-置換基) とアミノ基との間の脱 H-X 縮合によることがふつうである。X としては、ハロゲンが好ましい。X がハロゲンである誘導体、すなわち 1-ハロゲン-2, 4-ジニトロベンゼンが好ましいのは、一般に、オリゴヌクレオチドの塩基部分のアミノ基とは反応しないで 5'-水酸基末端延長上の一級アミノ基とのみ選択的に反応し、しかも反応操作が簡便だからである。とりわけ、1-フルオロ-2, 4-ジニトロベンゼンは市販され容易に入手でき、種々な反応条件で化合物 [VI] のアミノ基との反応が進行する。

1-ハロゲン-2, 4-ジニトロベンゼンと化合物 [VI] との反応は、両者の均一溶液中(溶媒は、たとえば含水アルコール)あるいは不均一溶液中

トリフルオロアセチル基の場合は、アンモニア処理により充分脱離されるが、オルトニトロフェニルスルフェニル基である場合はメルカプトエタノール処理が必要である。 $R^4$  として他の保護基を用いた場合は、オリゴヌクレオチド部分が安定な条件で、さらに別の処理を加えることも可能である。なお、デオキシオリゴリボヌクレオチドの合成法は既に各種のものが公知であつて、保護基の種類およびその導入ないし除去ならびに縮合その他について上記以外の詳細は核酸の化学合成に関する成書や総説たとえば「ヌクレオシド・ヌクレオチドの合成」(丸替 1977 年)、「核酸有機化学」(化学同人 1979 年)、「核酸」(朝倉書店 1979 年)、Tetrahedron, 34, 3143 (1978)、有合化, 34, 723 (1978) および化学の領域, 33, 566 (1979) 等を参照することができる。

#### 化合物 [VII] の合成

DNP-オリゴデオキシリボヌクレオチド(化合物 [VII]) は、上記化合物 [VI] の 5'-末端延長上の一級アミノ基に 2, 4-ジニトロベンゼンを結合

(溶媒は、たとえば水)、ハロゲン化水素捕捉剤(たとえば、炭酸水素ナトリウム、トリエチルアミン、水酸化カリウム等)の存在下に、10~50℃程度の温度で実施することができる。目的生成物は、たとえば抽出によつて回収すればよい。なお DNP 化に関しては、適当な総説、たとえば「実験化学講座 1、蛋白質の化学 II、第 118 頁」(1976 年(丸替(株)発行)等を参照することができる。

#### 実験例

##### 1) フローチャート

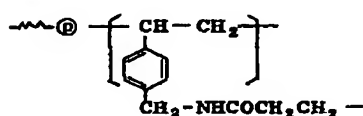
第 2 図のフローチャートに従つて、本発明化合物(同図の化合物①)を製造した。

第 2 図で、記号は次の意味を持つ。

B' ベンゾイル化アデニン

B アデニン

DMTr ジメトキシトリチル



R<sup>0</sup> オルトクロロフェニル

Et エチル

CF - シアノエチル

m 2

n' 2

n 12

## 2) 化合物[VI] (第2図の⑩) の合成

## 実験 1 - 1

ジメチキソトリチルアデノシン/樹脂[①]

(樹脂は担体に過ぎないが、樹脂に担持された目的化合物は外観的には樹脂そのものと変わらないので、樹脂に担持された当該化合物を以下において単に樹脂と呼ぶことにする) 300mg (0.033mmol) をイソプロパノール-塩化メチレン (15:85, V/V) 溶液 10ml で3回洗浄後、臭化亜鉛の 1.0M のイソプロパノール-塩化メチレン溶液 8ml で5分間ずつ4回反応(脱トリチル化)させて樹脂[②]を得る。樹脂[②]をイソプロパノール-塩化メチレン溶液 10ml で3回洗浄し、これにジヌクレオチド[③] 150mg (0.1mmol) のピリジ

ンをクロロホルムに溶解した後、水、0.5Mリン酸二水素ナトリウム水溶液、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液および5%の塩化ナトリウム水溶液でそれぞれ洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥する。クロロホルム層を蒸餾後、シリカゲルカラムで精製(溶出液として0~4%のメタノール含有クロロホルムを使用)し、溶出液を蒸餾後ペンタン中に滴下し粉末状の化合物[⑤]を得る。

上記で合成した化合物[④] (n=12) 115mg, (3.45μmol) を前述と同様の方法で脱トリチル化したもの[⑦]に、化合物[⑤] 60mg (0.04mmol) をトリエチルアミン-ピリジン-水 (1:3:1, V/V) 溶液 3ml で処理(脱シアノエチル化)した化合物[⑧]を加え、無水にしたのち、MSNT 50mg (0.2mmol) およびピリジン 1ml を加え90分間反応(縮合)させ、反応終了後ピリジンおよびメタノールで洗浄し、乾燥して、完全に保護されたオリゴヌクレオチド誘導体[⑨]を得る。

オリゴヌクレオチド誘導体[⑨] 15mg を 0.5M

ン溶液を添加後、共沸させて系を無水とし、メシチレンスルホニルニトロトリアゾリド(以下MSNTと記す) 150mg (0.5mmol) と無水ピリジン 2ml とを添加して90分間反応(縮合)させる。反応後、ピリジン 10ml で3回洗浄し、炭酸塩(約10mg)のジメチルアミノピリジン(以下DMAP)を含む無水酢酸-ピリジン (1:9, (V/V)) 溶液 10ml を添加し10分間反応させて未反応5'-水酸基をアセチル化して保護し、これをピリジンで洗浄して、化合物[④'] (n=2) を得る。以上のような操作を6回くり返して、化合物[④] (n=12) を得る。

一方、5'-ヒドロキシ-ジヌクレオチド[⑤] 800mg (0.71mmol) とオルトクロロフェニルホスホトリアゾリドとを後者のジオキサン溶液 (1.0mmol, 6ml) 中で2時間反応させ、続いてトリフルオロアセチル-6-アミノヘキサノール 300mg (1.4mmol) および1-メチル-イミダゾール 115mg (1.4mmol) を加えてさらに2時間反応させる。反応終了後、溶媒を留去し、残渣

テトラメチルグアニジン-ピリジン-2-カルボアルドキシメイトのジオキサン-水 (9:1, (V/V)) 溶液 200μl を加え、遠心管中、室温で24時間反応させる。反応後、緩アンモニア水 (2.5ml) を加えて密閉し、50℃で一晩反応させる。反応終了後、ろ過し、ろ液を蒸餾後、水に溶解してからエーテルで抽出を行なう。水層を蒸餾後、セファデックス G-50 (φ1.5 × 120cm, 溶出液は 0.05M の重炭酸トリエチルアンモニウム緩衝液 pH 7.5) で脱塩精製しペンタデカアデニル酸誘導体[⑩]を得た。

また同様の方法で実験 1 - 2、1 - 3 および 1 - 4 のようなオリゴヌクレオチド誘導体を得た。以上で合成した化合物を第1表に示す。

第1表

実験例	m+n	化合物⑩の内容	
		(B) <sub>m+n</sub>	B
1-1	14	AAAAAAAAAAAAAAAA	
1-2	14	TTTTTTTTTTTTTTTT	
1-3	14	GGATGCATCACCACC	
1-4	16	AATCTGGTGAGAAAGCGC	

ただし、この表でAはアデニン、Tはチミン、Gはグアニン、Cはシトシンを示す。

これら4種の化合物の高速液体クロマトグラフィーの結果を第3図に示す。A～Dは、それぞれ実験1-1～1-4の化合物についての図である。

### 3) 2, 4-ジニトロフェニル-ペンタデカアデニル酸〔⑩〕の製造

#### 実験2-1

上記実験1-1で合成したペンタデカアデニル酸誘導体〔⑩〕約1.0 ODを0.1 M 炭酸水素ナトリウム水溶液 (pH 8.3) 10 ml に溶解し、1-フルオロ-2, 4-ジニトロベンゼンのエタノール溶

液 (50 mg/ml) 5 μl (大過剰) を加えて37℃で2時間反応させた後、水30 μl を加えエーテル150 μl で4回抽出を行ない、2, 4-ジニトロフェニル-ペンタデカアデニル酸〔⑩〕を得る。反応の確認は、高速液体クロマトグラフィーにより行なつた。

またその際、反応性の比較のため上記で合成したオリゴヌクレオチド〔⑦〕を脱保護して得た5'-水酸基をもつ化合物〔⑧〕も同様に1-フルオロ-2, 4-ジニトロベンゼンと反応させる。

上記実験1-2、1-3および1-4で合成した化合物〔⑩〕についても実験2-1と同様な操作を行なつて各々について化合物〔⑩〕を製造する。また、反応の比較のため5'-水酸基をもつ化合物〔⑧〕をも製造し、化合物〔⑧〕と1-フルオロ-2, 4-ジニトロベンゼンとを各々反応させる。このときの実験を各々実験2-2、2-3および2-4とした。

実験2で製造した化合物を第2表に示す。

第2表

実験例	化合物⑧の内容		化合物⑩の内容	
	n	(B) <sub>n</sub>	m+n	(B) <sub>m+n</sub>
2-1	12	AAAAAAAAAAAA	14	AAAAAAAAAAAAAAAA
2-2	12	TTTTTTTTTTTT	14	TTTTTTTTTTTTTTTT
2-3	12	ATGCATCACCACC	14	GGATGCATCACCACC
2-4	14	TCTGCTGAGAAAGCGC	16	AATCTGGTGAGAAAGCGC

ただし、この表でAはアデニン、Tはチミン、Gはグアニン、Cはシトシンを示す。

以上の結果を第4図(高速液体クロマトグラフィーの結果)に示す。

第4図は高速液体クロマトグラフィーの溶出パターンを示すものである。図中、1は何れも反応前の化合物そのもの、2は何れも化合物と1-フルオロ-2, 4-ジニトロベンゼンとを反応させたもの、のクロマトグラムである。イは実験2-1で式〔⑩〕である化合物、ロは実験1-1で式〔⑩〕である化合物、ハは実験2-2で式〔⑩〕である化合物、ニは実験1-2で式〔⑩〕である化合物、ホは実験2-3で式〔⑩〕である化合物、ヘは実験1-3で式〔⑩〕である化合物、トは実験2-4で式〔⑩〕である化合物、チは実験1-4で式〔⑩〕である化合物について上記のような操作を行なつた際のクロマトグラムを示す。なおピーク上の数値は保持時間を示す。

これらの結果からみれば、式〔⑩〕で示される5'-水酸基をもつ化合物(第4図のイ-1、ハ-1、

ホ-1、およびト-1)は1-フルオロ-2,4-ジニトロベンゼンと反応していないことがわかる(第4図イ-2、ハ-2、ホ-2、およびト-2)。

それに対してオリゴヌクレオチド誘導体〔⑩〕は1-フルオロ-2,4-ジニトロベンゼンと反応させると、高速液体クロマトグラフィーの溶出パターンに変化が生じて、原料のピーク(第4図ロ-1、ニ-1、ヘ-1およびチ-1)はなくなっており、1-フルオロ-2,4-ジニトロベンゼンと反応して新しい化合物(第4図ロ-2、ニ-2、ヘ-2およびチ-2)ができていることがわかる。

すなわち、一級アミノ基を有する化合物〔⑪〕は1-フルオロ-2,4-ジニトロベンゼンと選択的に反応し、5'-水酸基をもつ化合物〔⑫〕とは全く反応しないことがわかる。

なお、第4図の保持時間5分程度で各々溶出されるピークは、2,4-ジニトロフェノールと考えられる。

上記において、高速液体クロマトグラフィーは日本分先HPLC System Tri-Rotermを用い、次の条件により測定を行なった。

カラム :  $\mu$ -Bondapak C18 (Waters)

流速 : 2 ml/分

溶出液 : アセトニトリルを含む、20 mM-TEAA緩衝液 (pH 7.2)。

濃度勾配 : アセトニトリルの濃度 6 ~ 14 % / 16分 (16分以後は14%を続ける)。

#### 4. 図面の簡単な説明

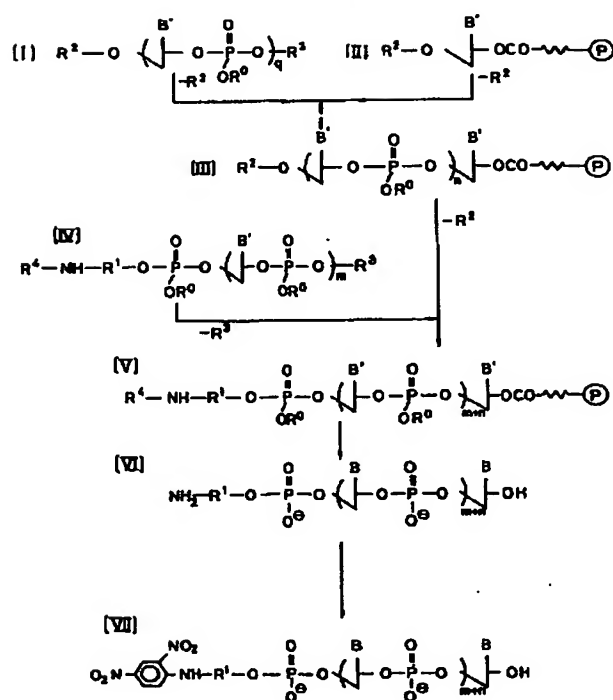
第1図は、本発明の化合物を合成する方法の一例を示すフローチャートである。

第2図は、実験例で示した本発明化合物の製造法のフローチャートである。

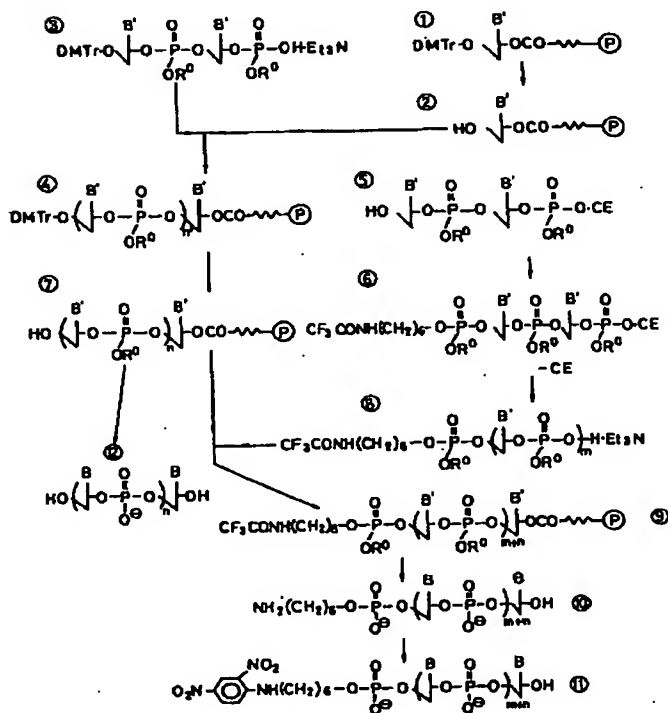
第3図A~Dは、実験例で示した化合物〔VI〕の高速液体クロマトグラフィーの結果を示す図である。

第4図は、高速液体クロマトグラフィーの溶出パターンを示す図である。

第1図

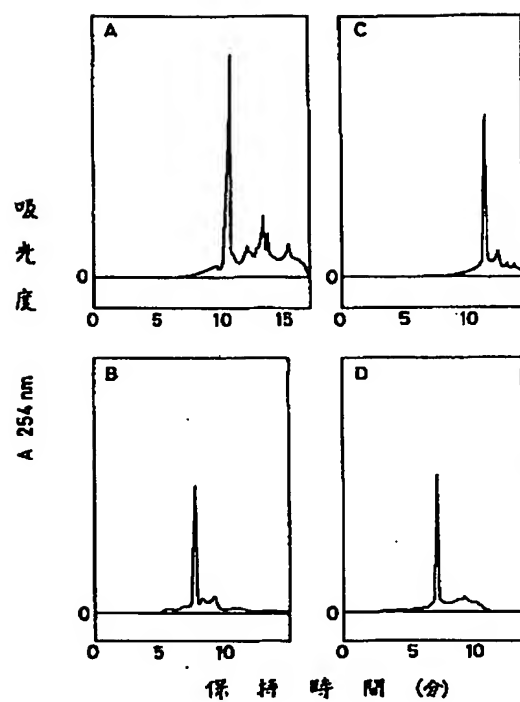


第2図

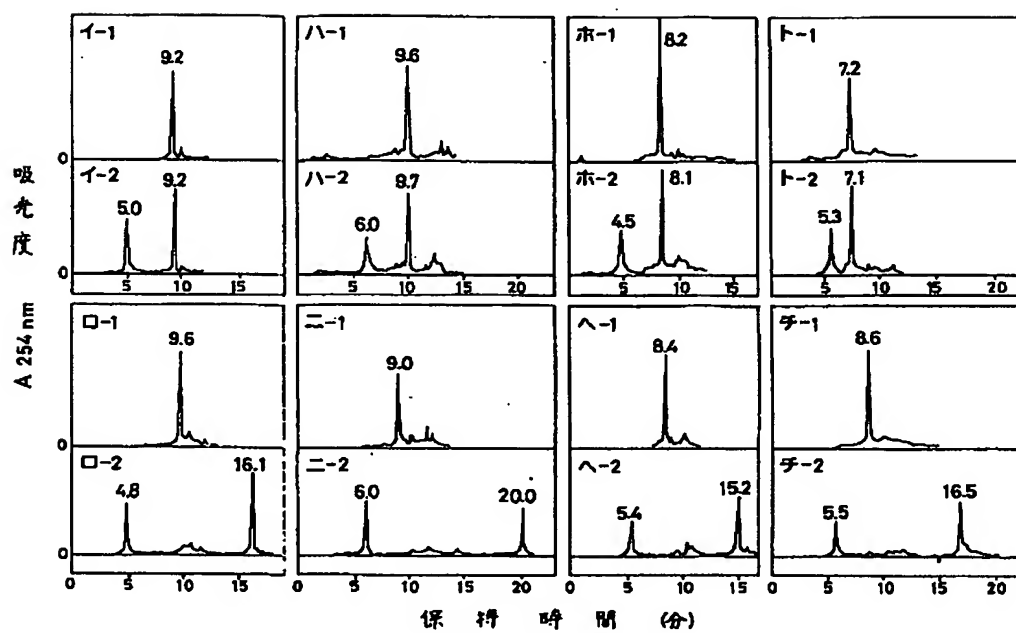




第 3 図



第 4 図



特許法第17条の2の規定による補正の掲載

昭和 58 年特許願第 75878 号 (特開昭  
59-204200 号, 昭和 59 年 11 月 19 日  
発行 公開特許公報 59-2042 号掲載) につ  
いては特許法第17条の2の規定による補正があっ  
たので下記のとおり掲載する。 1 ( 2 )

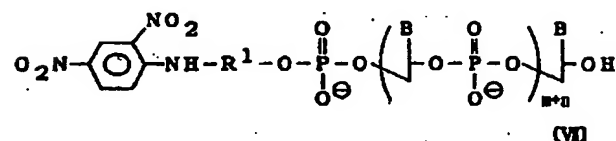
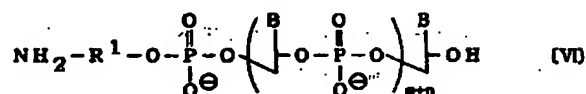
Int. Cl. <sup>1</sup>	識別 記号	庁内整理番号
C07H 21/02		7417-4C
// C12Q 1/68		A-6807-4B
G01N 33/50		P-7055-2G

B. 補正の内容

- (1) 発明の名称「2, 4ジニトロフェニルヌクレオチド誘導体およびその製造法」を「2, 4-ジニトロフェニルヌクレオチド誘導体」に補正する。
- (2) 特許請求の範囲を別紙の通り補正する。
- (3) 明細書第4頁12～13行の「本発明は、……にも関する。」を削除する。
- (4) 同書第6頁15行から第7頁1行の「また、……〔VI〕」を削除する。
- (5) 「オリゴヌクレオチドの放射性」を「オリゴヌクレオチドの検出に放射性」に補正する。
- (6) 同書第8頁最終行～第9頁2行の「このよう……考えられる。」を削除する。
- (7) 同書第9頁7～8行の「蛍光性染色体による」を「蛍光性染色による」に補正する。
- (8) 同書第9頁15行～16行の間に「このよう……長所があるところから、本発明のDNP-ヌクレオチド誘導体の利用方法の拡大も考えられる。」を改行して挿入する。

- (9) 同書第11頁12行の「一つの好ましい方法は、」と「前記の式〔VI〕」の間に下記の内容を挿入する。

「下式〔VI〕で示されるオリゴヌクレオチド誘導体の末端アミノ基に2, 4-ジニトロベンゼンを結合させて下式〔VII〕で示されるDNP-オリゴデオキシリボヌクレオチドを得ること、を特徴とするものである。



〔ただし、mおよびnはそれぞれ0または任意の自然数であり、R<sup>1</sup>は2価の直鎖または分岐鎖の炭化水素残基であり、Bはヌクレオチドを構成する塩基である (Bが複数個存在するときは、それ

平成 2. 2. - 6 発行

手 続 補 正 書

平成 1 年 8 月 2 日

特許庁長官 吉 田 文 毅 殿

1 事件の表示

昭和 58 年特許願第 75878 号

2 発明の名称

2, 4-ジニトロフェニルヌクレオチド誘導体

3 補正をする者

事件との関係 特許出願人  
瑞永製薬株式会社

4 代 理 人 (郵便番号 100)

東京都千代田区丸の内三丁目2番3号  
(電話東京 (211)2321 大代表)

6426 弁護士 佐 藤 一

5 補正命令の日付

発送日 平成 年 月 日

6 補正により減少する発明の数 1

7 補正の対象

明細書の「発明の名称」、「特許請求の範囲」、及び「発明の詳細な説明」の各欄

特許庁

1 R 2 A

らは同一でも異なってもよい)。」

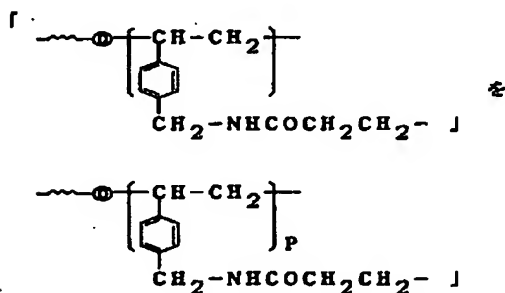
すなわち、この方法は、」

(10) 同書第16頁7行の「デオキシオリゴリボヌクレオチド」を「オリゴデオキシリボヌクレオチド」に補正する。

(11) 同書第17頁13行の「5' - 水酸基末端」を「5' - 末端」に補正する。

(12) 同書第18頁8行の「(1976年(丸巻)(株)発行)」を「(1976年、丸巻(株)発行)」に補正する。

(13) 同書第18頁最終行の



「第 2 表

例 実 験 体 例	化合物②の内容		例 実 験 体 例	化合物①の内容	
	n	(B) <sub>n</sub> B		m+n	(B) <sub>m+n</sub> B
3-1	12	AAAAAAAAAAAA	2-1	14	AAAAAAAAAAAAAAAA
3-2	12	TTTTTTTTTTTT	2-2	14	TTTTTTTTTTTTTT
3-3	12	ATGCATCACCAC	2-3	14	GGATGCATCACCAC
3-4	14	TCTGCTGAGAAGCC	2-4	18	AATCTGCTGAGAAGCC

(22) 同書第26頁9～10行の「実験2-1」を「実験3-1」に補正する。

(23) 同書第26頁10行の「実験1-1」を「実験2-1」に補正する。

(24) 同書第26頁11行の「実験2-2」を「実験3-2」に補正する。

(25) 同書第26頁12行の「実験1-2」を「実験2-2」に補正する。

(26) 同書第26頁13行の「実験2-3」を「実験3-3」に補正する。

(27) 同書第26頁14行の「実験1-3」を

に補正する。

(14) 同書第19頁5行の「n' 2」を削除する。

(15) 同書第22頁2行の「アルドキシメイト」を「アルドキシム」に補正する。

(16) 同書第24頁3行の「4回抽出」を「4回試薬の除去」に補正する。

(17) 同書第24頁10行の「と反応させる。」を「と反応させる。(対照実験3-1)。」に補正する。

(18) 同書第24頁13行の「を製造する。」を「を製造する。この実験をそれぞれ2-2、2-3、2-4とする。」に補正する。

(19) 同書第24頁下から3～2行の「実験2-2、2-3および2-4」を「実験3-2、3-3および3-4」に補正する。

(20) 同書第24頁最終行の「化合物を」を「化合物および対照実験3を」に補正する。

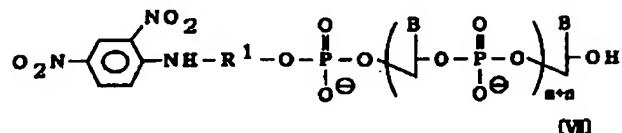
(21) 同書第25頁の第2表を次の通り補正する。

「実験2-3」に補正する。

(28) 同書第26頁14～16行の「実験2-4……実験1-4」を「実験3-4で式〔②〕である化合物、チは実験2-4」に補正する。

## 特許請求の範囲

1. 下式〔Ⅶ〕で示される2,4-ジニトロフェニル・オリゴデオキシリボヌクレオチドであることを特徴とする、2,4-ジニトロフェニルヌクレオチド誘導体。



(ただし、mおよびnはそれぞれ0または任意の自然数であり、 $\text{R}^1$ は2価の直鎖または分岐鎖の炭化水素残基であり、Bはヌクレオチドを構成する塩基である(Bが複数個存在するときは、それらは同一でも異なってもよい)。)

2. 塩基Bがアデニン、チミン、シトシンおよびグアニンからなる群より選ばれたものである、特許請求の範囲第1項記載の2,4-ジニトロフェニルヌクレオチド誘導体。

3.  $\text{R}^1$ が炭素数2~20の直鎖または分岐

鎖のアルキレン基である、特許請求の範囲第1項または第2項記載の2,4-ジニトロフェニルヌクレオチド誘導体。

4. mが0または6までの自然数、nが0または40までの自然数である、特許請求の範囲第1~3項のいずれか一項に記載の2,4-ジニトロフェニルヌクレオチド誘導体。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**